

Diss. ETH No. 19643

The Role of Poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) in Cell Death

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Science

presented by
CHRISTIAN BLENN
Dipl. agr. biol., University of Stuttgart-Hohenheim, Germany

Date of birth
29.12.1977

citizen of
GERMANY

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Wolfgang Langhans
Prof. Dr. Felix R. Althaus

2011

1. Zusammenfassung

Genotoxische Zellschädigung kann die unmittelbare posttranslationale Modifikation von Proteinen mit Poly(ADP-ribose) (PAR) initiieren. Das Zellkernprotein Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) bindet an geschädigte DNA und wird dadurch katalytisch aktiv. PARP-1 synthetisiert lineare, aus bis zu 200 Monomeren bestehende, polymere PAR-Moleküle, die bis zu maximal 3% Verzweigungen aufweisen können. Das Substrat für diese Reaktion ist NAD^+ . PARP-1 bindet selbst die Mehrzahl der PAR-Moleküle, nur 5-10% aller PAR-Moleküle sind kovalent mit anderen Akzeptorproteinen assoziiert. Die Halbwertszeit von PAR variiert je nach Struktur, Komplexität und Proteinbindung, zwischen Sekunden und Stunden und ist des Weiteren vom Grad und Typ der genotoxischen Schädigung abhängig. PAR wird enzymatisch durch das Enzym PAR-Glycohydrolase (PARG) gespalten. Durch exo- und endoglycosidische Aktivität entsteht, neben isolierten PAR-Ketten, vorrangig freie ADP-Ribose. Nur das koordinierte Zusammenspiel von PARP-1 und PARG ermöglicht eine korrekte zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung und gewährleistet die genomische Stabilität. Während die Rolle von PARP-1 intensiv untersucht worden ist, weiss man nur wenig über die biologische Funktion von PARG. Studien mit Inhibitoren und in partiellen *parg* knockout Modellen deuten auf einen Einfluss von PARG in der Steuerung von Zelltodprozessen nach alkylierender oder oxidativer DNA-Schädigung hin. Der letale Phänotyp der *parg*^{-/-} Mutanten, sowie der Mangel an spezifischen und zellpermeablen Enzymhemmern verhinderte bisher eine genaue Abklärung der biologischen Funktion von PARG im toxinvermittelten Zelltod. Wir etablierten daher kleine interferierende RNA-Moleküle (siRNAs) die spezifisch die mRNA des *parg* Gens in humanen und murinen Zellen eliminieren (RNA-Interferenz). Durch diese Methode gelang es uns 72 h nach Transfektion der siRNA, den Gehalt an *parg* mRNA, PARG Protein und enzymatischer Aktivität von PARG auf bis zu 10% des Basalwertes zu reduzieren. Der verbleibende Enzymgehalt sicherte die Grundfunktionen der Zelle. Die Proliferation und DNA-Reparatur nach subletaler Dosis von H_2O_2 war nicht beeinträchtigt. Werden die PARG-reduzierten Zellen jedoch mit letalen Konzentrationen H_2O_2 behandelt, so reagieren sie weniger sensitiv auf den toxischen Angriff. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PAR-Moleküle nach H_2O_2 -Applikation eine verlängerte Persistenz aufweisen, wenn das PAR-degradierende Enzym PARG mittels RNAi reduziert wurde. Dawson et al. publizierten eine übergeordnete und direkte Verbindung von PAR und dem Zelltodmediator *Apoptosis Inducing Factor* (AIF). Dieser transloziert nach PAR-Applikation von den Mitochondrien in den Zellkern. Auf dieser Studie basierend, untersuchten wir mittels RNAi den individuellen Beitrag der PAR-metabolisierenden Enzyme PARP-1, PARP-2 und PARG in humanen Zellen (HeLa) nach Behandlung mit dem alkylierenden Agens N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidin (MNNG). Auf molekularer Ebene ist der MNNG-induzierte Zelltod unter anderem durch die Bildung von PAR, einem gestörten Gleichgewicht von ATP/ADP, der Aktivierung der Zelltodproteasen Caspasen 7 und 9 sowie der Translokation von AIF charakterisiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass nur PARP-1 – und nicht PARP-2 oder PARG

– eine Funktion im MNNG-induzierten Zelltod hat. PARP-1-generierte PAR-Moleküle sind können eine AIF-Translokation auslösen. Im Gegensatz dazu konnten PARP-2-synthetisierte, sowie durch PARG RNAi modifizierte PAR-Moleküle diesen Effekt nicht einleiten.

In einem anschliessenden Projekt untersuchten wir Zelltodkaskaden nach letalem oxidativen Stress in embryonalen murinen Fibroblasten (MEFs) in An- bzw. Abwesenheit von PARG. Wir beobachteten, dass PARG-reduzierte Zellen weniger anfällig auf H₂O₂-induzierte Zytotoxizität reagierten. Unsere Hypothese war, dass spezifische PAR-Metabolite eine Funktion in der Zelltodsignalkaskade einnehmen könnten. Insbesondere interessierte uns die Rolle von ADP-Ribose, dem finalen Produkt des PARP/PARG-Zyklus. In der Literatur wurde aufgezeigt, dass ADP-Ribose *in vitro* spezifisch und mit hoher Affinität an membranständige Kalziumkanäle bindet. Daher etablierten wir eine fluoreszenzspektrometrische Messmethode für zytosolisches Kalzium (Ca²⁺), um den Anstieg zytosolischer Ca²⁺-Gehalte nach H₂O₂-Behandlung in Zellkulturen zu bestimmen. Die Verwendung von diversen PARP-Inhibitoren, PARP-1 RNAi, sowie *parp-1*^{-/-} Zellen zeigte eine PAR-Abhängigkeit des Ca²⁺-Einstroms nach H₂O₂ auf. Als Konsequenz des verringerten Ca²⁺-Einstroms wurde die Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Zellkern gehemmt, welches das Überleben der Zellen trotz massiver toxischer Schädigung sicherte. Bereits früher wurden *in vitro* die membranständigen Ca²⁺-Kanäle *Melastatin-like transient receptor potential 2 channels* (TRPM2) als ADP-Ribose-sensitiv beschrieben. Aus der Literatur ist bekannt, dass TRPM2-Kanäle extrazelluläre Ca²⁺-Ionen transportieren, nachdem intrazellulär monomere – nicht aber polymere – ADP-Ribose gebunden hat. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Aktivität von PARP-1 übergeordnet von TRPM2 agiert. Weil ADP-Ribose das finale Produkt des PARP/PARG-Zyklus darstellt, testeten wir die Hypothese, dass eine gehemmte PARG-Aktivität den TRPM2-abhängigen Ca²⁺-Transport inhibieren kann. Wir konnten zeigen, dass RNAi von PARG den TRPM2-abhängigen Ca²⁺-Einstrom nach H₂O₂ hemmt. Das führte zu einer verminderten Translokation von AIF und erhöhte die Überlebensrate der Zellen nach H₂O₂. Pharmakologische Hemmung und RNAi von TRPM2 bestätigte diese Ergebnisse. In Experimenten ohne exogenen Stress konnten wir zeigen, dass intrazellulär applizierte ADP-ribose *per se* den TRPM2-abhängigen Ca²⁺-Einstrom auslösen kann. Somit kann gesagt werden, dass ADP-Ribose der Schlüsselmetabolit des PARP/PARG-Zyklus ist, der für einen TRPM2-abhängigen Ca²⁺-Transport verantwortlich ist.

Unsere Resultate identifizierten einen PARP/PARG-abhängigen Zelltodmechanismus, welcher Signalkaskaden zwischen Zellkern, Zellmembran, Zytosol und Mitochondrien beinhaltet. Drei chemisch verschiedene Boten interagieren in Abhängigkeit voneinander: Nukleotide, Kationen und Proteine.

Zusammenfassend tragen die Ergebnisse dazu bei, die biologischen Funktionen von PARP-1, PARP-2 und insbesondere PARG als Vermittler von DNA-Schädigungen und anschliessender Signalkaskaden zu verstehen. Die Aktivierung des PARP/PARG-Zyklus ist ein Mechanismus, der DNA-Schäden validiert und dadurch das Schicksal einer Zelle regulieren kann.

2. Summary

The post-translational modification of proteins with poly(ADP-ribose) (PAR) occurs as an early response to genotoxic insults. The nuclear poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) reacts to DNA nicks, activating its catalytical function and thereby producing large amounts of PAR. The substrate for this reaction is NAD⁺. Negatively charged linear PAR chains of up to 200 ADP-ribose monomers with maximal 3% branching are formed within minutes. Most of PAR is covalently bound on PARP-1 itself. Only 5-10% of PAR molecules are attached to other acceptor molecules. The turnover of PAR is tightly regulated. Its catabolic half-life ranges from seconds to hours depending on polymer size, complexity, protein association and the particular stress conditions to which cells are exposed. PAR glycohydrolase (PARG) degrades PAR via endo- and exoglycosidic activity. PARG produces primarily monomeric ADP-ribose albeit a few PAR polymers may arise. The coordinate action of PARP and PARG is required for proper cellular response to DNA damage and maintenance of genomic stability.

Although the role of PARP-1 has been extensively studied, the biological function of PARG is not well established so far. Several studies with inhibitors and partial knockout models of PARG pointed to a possible role for PARG enzyme in the regulation of cell death or survival after alkylation- and oxidant-induced DNA damage. However, the lack of potent and cell permeable inhibitory molecules for PARG and the lethal phenotype of *parg*^{-/-} mutants prevented the discovery of distinct functions in the cell death and survival network.

Therefore we developed a RNA interference (RNAi) approach against PARG to reduce the amount of PARG protein in human and murine cells. Silencing of the *parg* gene resulted in a time-dependent reduction of *parg* mRNA, PARG protein and enzymatic activity which was maximal after 72 h of siRNA transfection. We found that as little as 10% of PARG protein is sufficient to ensure basic cellular functions as cell proliferation and DNA damage repair after sublethal doses of oxidative stress (H₂O₂). Cell survival following higher concentrations of H₂O₂ was increased in cells lacking PARG. In fact, the resident time of PAR molecules after oxidative stress was prolonged in cells silenced for PARG resulting in a protective phenotype.

Dawson and collaborators demonstrated that PAR may act as a cell death signal upstream of apoptosis-inducing factor (AIF). In particular, PAR was found to mediate between DNA damage and translocation of AIF from mitochondria to the nucleus. On the basis of this information we used siRNA in human cells (HeLa) to selectively down-regulate the PAR metabolizing enzymes PARP-1, PARP-2 and PARG, either separately or in combination, to determine their individual contribution to modulate PAR as a cell death factor. Cell death mediated by the alkylating agent MNNG is characterized by the activation of PAR synthesis, moderate changes in ATP/ADP ratio of cells, activation of caspases 7 and 9 and finally AIF translocation from mitochondria to nucleus. We observed that only PARP-1, and not PARP-2 and PARG, are involved in this type of alkylation-induced cell death. PAR synthesized by

PARP-2 as well as modified PAR molecules due to PARG reduction were unable to promote AIF translocation.

We further investigated molecular signal cascades in oxidant-induced cell death in the presence or absence of PARG. As previously shown, PARG silenced cells are less sensitive to H₂O₂-induced cytotoxicity. The hypothesis was that specific PAR metabolites can act as a signalling factor in cell death, in particular monomeric ADP-ribose, that has been shown to bind to specific Ca²⁺ channels *in vitro*. We established a fluorescence spectroscopic determination of the influx of Ca²⁺ ions into the cytosol as an immediate response to an oxidative insult in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) with a manipulated PAR metabolism. Using a set of PARP inhibitors, RNAi against PARP-1 and *parp-1*^{-/-} cells, we investigated a PARP-dependent elevation of cytosolic Ca²⁺ after lethal doses of H₂O₂. Moreover, the translocation of AIF from mitochondria to nuclei was abolished when PARP function was eliminated leading to reduced cell death rates. Melastatin-like transient receptor potential channels 2 (TRPM2) were identified earlier required for Ca²⁺ gating from the extracellular space into the cytosol after oxidative insults. TRPM2 channels become activated by monomeric ADP-ribose, but not PAR and have been reported to act downstream of PARP-1. As free ADP-ribose is the final product of PARP/PARG cycle we tested the hypothesis, that PARG inhibition by RNAi could abolish the Ca²⁺ gating function of TRPM2. Indeed, we could demonstrate that cytosolic Ca²⁺ elevations after H₂O₂ were diminished when cells are silenced for the *parg* gene leading to a reduced cytotoxicity mediated by an impaired AIF translocation. Moreover, RNAi against TRPM2 as well as chemical inhibition of this channel showed a similar pattern in cytosolic Ca²⁺ fluxes after an oxidative insult. ADP-ribose loading of cells induces TRPM2 mediated Ca²⁺ fluxes in the absence of oxidative stress, suggesting that ADP-ribose is the key metabolite of the PARP/PARG cycle regulating TRPM2.

We conclude that the interplay of PARP-1 and PARG controls a cell death pathway that operates between nucleus, cytoplasm, cell membrane and mitochondria and communicates via three types of chemical messengers: a nucleotide, a cation and proteins. Overall the results of this study contribute to the understanding of the specific involvements of PARP-1, PARP-2 and especially PARG in the response to DNA damage and the subsequent signal cascade that translates the duration of genotoxic insults into the cell fate of programmed cell death.